Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.2, Summer 2020, P. 197-206
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۰۶-۱۹۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله علمی-پژوهشی

جوانه‌زنی جنین بالغ پکان (*Carya illinoensis*) در شرایط درون شیشه‌ای

مینا غزایی یان[۱]- غلامحسین داوری نژاد[۲]*- کمال قاسمی بزدی[۳]- حسین نعمتی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۲

چکیده

پکان یا گردوی گرمسیری (*Carya illinoensis*) از خانواده گردوئیان (Juglandaceae) و از محصولات خشکباری با ارزش می‌باشد. این گیاه از معدود میوه‌های خشکبار است که در مناطق نیمه گرمسیری کشور قابل کشت است. مهم‌ترین روش تکثیر پکان استفاده از پیوند است. بیشترین پایه تجارتی مورد استفاده برای پیوند پکان، نهال‌های بذری خود پکان است. تولید کنندگان نهال معمولاً بذور حاصل از گرده افشانی آزاد را جهت تولید نهال بذری استفاده می‌کنند. بذر برای پایه معمولاً از درختان قوی و یکنواخت گرفته می‌شود. در این آزمایش که به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد، اثر دو نوع محیط‌کشت، تعدادی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و سرمادهی بذور بر روی جوانه‌زنی جنین بالغ پکان در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. محیط‌کشت‌های مورد استفاده شامل محیط‌کشت موراشی و اسکوگ (MS) و محیط‌کشت درختان چوبی (WPM) بودند. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل ایندول بوتیریک اسید (صفر و یک میلی‌گرم در لیتر)، بنزیل آمینو پورین (صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر) و جیبرلیک اسید (صفر و یک میلی‌گرم در لیتر) بودند. تیمار سرمادهی بذور به مدت ۱۵ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد اثر مثبتی بر روی درصد جوانه‌زنی و طول ساقه نداشت. نتایج نشان داد که بین محیط‌کشت‌ها اختلاف معنی‌داری از نظر میزان جوانه‌زنی در هر دو تیمار سرمادهی بذور و کشت بلافاصله بعد از برداشت (بدون سرمادهی) وجود داشت. بر این اساس بیشترین جوانه‌زنی در محیط‌کشت MS بود. همچنین بهترین رشد گیاهچه در محیط‌کشت MS با میزان یک میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید، یک میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک و دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ازدیاد، جنین، کشت درون شیشه‌ای، گردوسانان

مقدمه

خانواده گردوسانان یا Juglandaceae دارای ۷ جنس و حدود ۶۰ گونه می‌باشد. جنس جوگلانز (*Juglans*) و کاریا (*Carya*) از جمله مهم‌ترین جنس‌های این خانواده می‌باشند که دارای ارزش تجاری و اقتصادی هستند. پکان (X=16)، از جنس کاریا، با ۳۲ عدد کروموزوم، درختانی بزرگ، خزان کننده با پوست خشن به ارتفاع حداکثر ۵۰ متر و قطر تنه ۱۸۰ سانتی‌متر می‌باشند. ریشه‌ها معمولا عمیق و محوری هستند (مشابه گردو) و دارای ریشه‌های فرعی سطحی می‌باشند. گل‌ها تک‌پایه، تک‌جنس، پرچم‌ها سه‌شاخه، گل‌ها ناقص و فاقد گلبرگ و کاسبرگ و به رنگ سبز می‌باشند. گل‌های نر به شکل شاتون‌های خوشه‌ای باریک و دراز و گاهی دارای گل‌های تک‌تک که بر روی چوب یک‌ساله به صورت جانبی ظاهر می‌شوند و دارای ۷-۳ پرچم در هر گل و کاسبرگ‌ها ۳-۲ لبه‌ای است. گل‌های ماده به شکل اسپایک بوده و در انتهای شاخه‌های حاصل از رشد فصل‌جاری در دسته‌های ۲ تا ۱۰ تایی ظاهر می‌شوند. هر یک از گل‌ها دارای برگه یا براکته است و تخمدان تک حجره‌ای می‌باشد. میوه به شکل گرد و یا تخم‌مرغی کشیده که دانه آن دارای یک پوشینه گوشتی یا هاسک می‌باشد و این پوشینه دارای چهار قاچ است که صاف و کمی زبر و برجسته هستند. دانه پوشیده از پوسته ضخیم یا نازک است. مغز دانه یا بذر آن دارای مزه شیرین است. میوه‌ها به‌صورت انتهایی بر روی شاخه‌های حاصل از رشد فصل جاری دیده می‌شوند (۲۵). پکان تنها جنس از خانواده گردوسانان است که شرایط گرم مناطق را به خوبی تحمل می‌کند (۲).

از نظر گرده‌افشانی این گیاهان اغلب دارای حالت دیکوگامی هستند. یعنی بین زمان پراکنش گرده با زمان پذیرش مادگی تطابق وجود ندارد. بر این اساس ارقام پکان به دو گروه پروتاندروس (نر پیش رس) و پروتوژینوس (ماده پیش رس) تقسیم می‌گردند (۱). لذا جهت حصول عملکرد مطلوب و میوه با کیفیت در زمان احداث باغ

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: davarynej@um.ac.ir)
۳- عضو هیأت علمی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، ایران

DOI: 10.22067/jhorts4.v34i2.71121

می‌بایست ارقامی مورد کشت و کار قرار گیرند که از نظر زمان گرده‌افشانی با هم تطابق زمانی داشته باشند.

جنین در گیاهان یک ساختار چندسلولی است که توانایی تولید یک گیاه جدید را دارا است. جنین گیاهی آغازگر نسل اسپوروفیتی می‌باشد و ممکن است از سلول خاصی مانند سلول تخم و یا از سلول‌های سوماتیکی حاصل شود. اولی تحت عنوان جنین جنسی و دومی به عنوان جنین سوماتیکی یا غیرجنسی شناخته می‌شود. جنین دارای ساختار دوقطبی متشکل از ساختار پریموردیای ریشه و ساقه می‌باشد. به‌طور طبیعی جنین دارای ساختارهای لازم برای تولید یک ارگانیسم کامل از خیلی کوچک تا خیلی بزرگ مانند درخت غول یا سکویا می‌باشد. وجود این قابلیت بزرگ در جنین به آن جایگاه خاصی را می‌دهد. اگرچه تحت شرایط نرمال و مطلوب جنین‌های جوان بلوغ خود را به‌دست آورده و قابلیت‌شان را بروز می‌دهند اما در شرایط خاصی هم طی مراحل نمو اولیه ممکن است سقط گردند. در این موارد، جنین‌ها (یا سلول‌های پیش‌جنینی) می‌توانند جهت پرهیز از سقط شدن تحت شرایط مطلوب قرار گیرند (۲۲). تکنیک کشت درون شیشه‌ای ابزاری قدرتمند در عملیات نجات جنین در جنین‌های نارس و همچنین جنین‌های فاقد آندوسپرم است. موفقیت تولید گیاه از جنین‌های نارس به میزان زیادی وابسته به مرحله رشدی جنین و ترکیب محیط‌کشت است. با وجود اینکه مرحله رشدی جنین بسیار تعیین‌کننده است اما در مواردی هم مشاهده می‌گردد که جنین‌های بسیار نارس با استفاده از محیط‌کشت‌های ترکیبی با موفقیت نجات یافته‌اند. هدف از کشت جنین، شکستن خواب، آزمون زیوایی بذر، کاهش دوره اصلاحی و غیره می‌باشد، حال آن‌که نجات جنین به مواردی برمی‌گردد که در آن جنین بدون عملیات نجات و به تنهایی قادر به بقا و تولید نهال نمی‌باشد. این شرایط می‌تواند به دفعات در مواردی که جنین از نظر ژنتیکی ضعیف است و یا حاصل از تلاقی‌های دور باشد رخ دهد. در برخی موارد جنین‌های با احتمال سقط به‌وسیله کشت تخمک یا تخمدان نجات می‌یابند (۲۱). رشد جنین یک سیستم پویا است که نشانگر تغییر نیازهای آن طی مراحل رشد و نمو است. هر چه جنین کوچک‌تر باشد نیازمند محیط‌کشت پیچیده‌تری می‌باشد.

تکنیک‌های کشت جنین در زمینه اصلاح گیاهان و همچنین مطالعات پایه‌ای در فیزیولوژی و بیوشیمی کاربرد زیادی دارند. مشکلات زیادی پیرامون کشت درون شیشه‌ای خانواده گردو وجود دارد. درصد پایین جوانه‌زنی و چرخه طولانی ازدیاد بذری گردو و لزوم تیمار سرمادهی برای تسهیل جوانه‌زنی، مهم‌ترین موانع بر سر راه توسعه ارقام پرمحصول از طریق دورگ‌گیری است (۸). روش‌های باززایی گیاه از طریق کشت جنین در محیط درون شیشه‌ای باعث غلبه بر موانع هیبریداسیون، سقط جنین و غیره می‌گردد، به‌علاوه سرعت پرآوری بیشتر و سریع‌تر از ژنوتیپ‌های برتر میسر می‌گردد. جنین‌ها به خاطر طبیعت نونهال خود دارای پتانسیل باززایی بیشتری بوده و بنابراین می‌توانند برای تکثیر درون شیشه‌ای به‌کار روند (۹).

هدف از کشت جنین شکستن خواب، آزمون زیوایی بذر، کاهش دوره اصلاحی و غیره می‌باشد. در این پژوهش هدف دستیابی به پروتکل جوانه‌زنی درون شیشه‌ای جنین بالغ پکان و تعیین بهترین ترکیب هورمونی برای رشد بعدی گیاه حاصله بود. نتایج این پژوهش می‌تواند برای تسریع پروسه تولید پایه‌های بذری یکنواخت و مناسب برای عملیات پیوند مورد استفاده قرار گیرد. بیشترین پایه تجارتی مورد استفاده برای پیوند پکان، نهال های بذری خود پکان است. همچنین می‌توان از گیاهچه‌های حاصله برای تهیه ریزنمونه‌های سالم از قطعات نوساقه در کشت درون شیشه‌ای استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش جهت یکنواختی و پرهیز از اثرگذاری هر عامل دیگر غیر از تیمارهای در نظر گرفته شده در شرایط درون شیشه‌ای از میوه رسیده یک پایه درخت بالغ پکان برای کشت در همه تیمارها استفاده شد. میوه‌های رسیده حدود ۵ ماه بعد از گرده‌افشانی آزاد (Half-sib) جمع آوری شدند. میوه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و پوست‌کنی شدند. نیمی از آنها جهت تیمار سرمادهی به مدت ۱۵ روز در پاکت کاغذی بسته بندی شده و در یخچال در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بقیه میوه ها ابتدا با آب شهری شستشو شدند. سپس به مدت دو دقیقه در اتانل ۹۶ درصد غوطه ور و سپس با آب مقطر استریل دو بار شستشو شدند. سپس میوه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم (وایتکس) با غلظت ۲/۸۳ درصد به مدت ۲۵ دقیقه غوطه‌ور شد و در نهایت ۳ تا ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. با گردوشکن، پوسته چوبی میوه با دقت زیاد و بدون آسیب رساندن به جنین جدا شد و جنین بالغ در شرایط استریل در محیط‌کشت مورد نظر کشت شد. محیط‌کشت پایه مورد استفاده برای کشت جنین‌ها، شامل محیط‌کشت موراشی و اسکوگ (MS) (۱۳) و محیط‌کشت درختان چوبی (WPM) (۱۲) بودند که با میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۹ گرم در لیتر آگار و یک گرم در لیتر زغال فعال غنی شدند. تنظیم pH محیط‌کشت بر روی ۵/۷ تا ۵/۸ و با استفاده از محلول یک نرمال هیدروکسید سدیم و اسید هیدروکلریک صورت گرفت. سپس استریلیزاسیون در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده شامل ایندول بوتیریک اسید (IBA) به میزان صفر و یک میلی‌گرم در لیتر، بنزیل آمینوپورین (BAP) به میزان صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر و اسید جیبرلیک (GA_3) به میزان صفر و یک میلی‌گرم در لیتر بودند. جیبرلیک اسید به دلیل

حساسیت به گرما بعد از اتوکلاو و زمانی‌که دمای محیط‌کشت به حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید در شرایط استریل و با استفاده از فیلتر سرنگی (با قطر ۰/۲۲ میکرون) به محیط‌کشت‌ها اضافه شد. بعد از کشت، تمام محیط‌کشت‌ها در ژرمیناتور در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۸۰۰ لوکس با نور فلورسنت برای مدت ۴ هفته قرار گرفتند. تمام کشت‌ها برای یک هفته در تاریکی قرار داده شده و سپس در معرض نور مورد نظر قرار گرفتند. بعد از یک‌ماه، گیاهچه‌های قوی به خاک استریل با ترکیب پیت‌ماس: ماسه نرم: پرلیت با نسبت ۱:۱:۱ انتقال یافته و پس از طی مراحل سازگاری به گلخانه منتقل شدند. تیمارهای هورمونی مورد استفاده در جدول شماره یک آمده است. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. در هر تکرار، دو جنین وجود داشت. شروع جوانه‌زنی از روز ششم پس از کشت ثبت شد. یادداشت‌برداری نهایی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه و تعداد برگ در روز ۲۵ پس از کشت ثبت شد. داده‌های حاصله با نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین اختلاف آماری بین میانگین‌ها نیز از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ($p≤0.05$) استفاده شد.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده برای هر یک از محیط‌کشت‌های MS و WPM

Table 1- PGRs treatments (mg l^{-1}) in MS and WPM media

تیمار Treatment	IBA	GA_3	BAP	تیمار Treatment	IBA	GA_3	BAP
T1	0	0	0	T7	1	0	0
T2	0	0	1	T8	1	0	1
T3	0	0	2	T9	1	0	2
T4	0	1	0	T10	1	1	0
T5	0	1	1	T11	1	1	1
T6	0	1	2	T12	1	1	2

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با جوانه‌زنی جنین بالغ پکان در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- ANOVA (mean squares) of pecan mature embryo germination traits *in vitro*

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی dF.	طول دوره جوانه‌زنی Germination period	میزان جوانه‌زنی Germination percentage	طول ساقه اصلی Main shoot length	تعداد برگ Leave no.	طول ریشه اصلی Main root length
تکرار Replication	2	5.15^{ns}	1126.85**	655.69**	1.75^{ns}	448.63^{ns}
پیش سرمادهی Cold pretreatment	1	1.77^{ns}	9462.91**	836.17*	9.50^{ns}	3277.56**
محیط‌کشت Media	1	96.69^{ns}	30645.12**	4522.56**	2584**	7817.50**
تنظیم کننده رشد PGRs	11	76.69*	4818.44**	394.68**	2.05*	589.96*
محیط‌کشت× تنظیم کننده رشد Media× PGRs	11	141.54**	7377.29**	194.80^{ns}	4.32**	777.76**
محیط‌کشت× پیش سرمادهی Media× Cold preteatment	1	40.11^{ns}	68.59^{ns}	41.17^{ns}	0.17^{ns}	423.67^{ns}
پیش سرمادهی × تنظیم کننده رشد Cold pretreatment×PGRs	11	33.59^{ns}	2935.92**	446.11**	2.02*	543.09*
پیش سرمادهی×محیط‌کشت ×تنظیم کننده رشد Cold pretreatment×Media×PGRs	11	52.41^{ns}	3085.35**	359.62**	1.74*	252.99^{ns}
اشتباه آزمایشی Error	94	33.15	312.93	128.81	0.90	245.11

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد.

ns , *,** non-significant, significant at 5 and 1% of probability level,respectively

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع محیط‌کشت، تیمار سرمادهی و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی توانستند بر روی دوره جوانه‌زنی، میزان جوانه‌زنی و رشد ساقه، رشد ریشه و تعداد برگ اثر معنی‌داری بگذارند (جدول ۲).

بر اساس نتایج، تیمار پیش‌سرمادهی بذور به مدت ۱۵ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بر روی درصد جوانه‌زنی و طول ساقه اثر معنی‌داری نشان داد ولی اثر متقابل این تیمار و محیط کشت اثر معنی‌داری بر روی هیچ یک از صفات نداشت (جدول ۳). در تحقیقات سایر محققان نیز پیرامون اثر پیش‌سرمادهی نتایج مختلفی وجود دارد. برخی محققان گزارش نمودند که جوانه‌زنی جنین‌ها بدون تیمار سرمایی یا بدون کاربرد هورمون GA_3 با کارایی پایینی انجام می‌شود. تیمار سرمایی یا GA_3، سطح هورمون ABA را کاهش می‌دهد و در نتیجه جوانه‌زنی افزایش می‌یابد. پیش سرمادهی و در ادامه قرار دادن جنین‌ها در برابر نور، جوانه‌زنی و رشد شاخه‌ها را افزایش داده است. این فرایند ممکن است در نتیجه شکستن خواب جنین در تیمار سرمایی و در ادامه جذب نور قرمز و نهایتا افزایش مقدار نسخه برداری ژن‌های تولید کننده GA_3 باشد (۴، ۱۷ و ۲۳).

در حالی‌که تانگ و همکاران (۲۳)، گزارش نمودند که جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی گردو در تیمار سرمادهی ضعیف بوده است. دنگ و کورنو (۳) و لی و همکاران (۱۰) هم گزارش مشابهی در گردو ارائه نمودند. آنها نشان دادند که جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی گردو در تیمار سرمادهی به همراه GA_3 پایین بوده است. این با نتایج تحقیق حاضر مشابه می‌باشد. این با نتایج تحقیق حاضر مشابه می‌باشد. اما تولک و مک‌گراناهان (۲۷) جوانه‌زنی مناسبی در جنین‌های سوماتیکی گردو که با سرما تیمار شده بودند به‌دست آورده و تولید گیاهچه نمودند. همچنین پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (۱۶) نشان دادند که کاربرد تیمار سرمایی و هورمون GA_3 به‌طور همزمان می‌تواند باعث افزایش میزان جوانه‌زنی در جنین نابالغ پکان گردد.

در پژوهش حاضر نوع محیط‌کشت بر روی آغاز جوانه‌زنی اثر معنی‌داری نداشت و کم‌ترین تعداد روز برای جوانه‌زنی ۶ روز ثبت شد. ولی نوع محیط‌کشت توانست درصد جوانه‌زنی و فاکتورهای رشدی گیاهچه را تحت تاثیر قرار دهد. بر این اساس بیشترین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه و تعداد برگ در محیط‌کشت MS در هر دو تیمار (سرمادهی و بدون سرما) بود. پیغام‌زاده و همکاران (۱۵) در آزمایشی به بررسی اثرات نوع محیط‌کشت، غلظت GA_3 و تیمارهای فیزیکی بر روی جوانه‌زنی جنین بالغ گردوی ایرانی پرداختند. آنها بیان نمودند که درصد جوانه‌زنی جنین‌ها هنگامی که تیمار سرمایی و اسید جیبرلیک به‌طور همزمان به کار برده شوند در مقایسه با هنگامی که آنها به‌طور جداگانه به‌کار می‌روند بیشتر است. چنانچه در نتایج آمده است رشد ساقه در محیط‌کشت MS بیشتر از WPM بود. هیل سادهولت و همکاران (۷) در گردو گزارش کردند که رشد شاخه‌های جانبی به‌طور معنی‌داری در محیط کشت DKW بیشتر از محیط کشت WPM و ریز شاخه‌هایی که در محیط کشت DKW رشد کردند نسبت به محیط‌کشت WPM ضخیم‌تر بوده و برگ‌های توسعه‌یافته و سبزتری داشتند.

همچنین در آزمایش حاضر بر روی پکان، طول ریشه‌ها در محیط‌کشت MS بیشتر از WPM بود. این نتایج مشابه نتایج در گردو است. ماپلی و همکاران (۱۱) گزارش کردند که در حدود ۲۶ درصد از اسید آمینه‌های آزاد در گیاهچه‌های یک‌ساله گردو در ریشه اصلی وجود دارد. همچنین آمینو اسیدهای آزاد ریشه اصلی مشابه آمینو اسیدهای آزاد محور جنینی است. آنها گزارش کردند که سیترولین نقش مهمی در انتقال آمینو اسیدهای آزاد و همچنین انتقال مجدد نیتروژن ذخیره شده در هنگام جوانه‌زنی گردو ایفا می‌کند. این آمینو اسید غیرپروتئینی در مدت جوانه‌زنی از ارنی‌تین سنتز می‌گردد. مقادیر زیاد ویتامین‌های موجود در محیط کشت MS ممکن است از طریق شرکت در واکنش‌های دکربوکسیلاسیون اسیدهای آلفا ستونی، ترانس‌آمیناسیون، واکنش‌های اکسیداسیون و احیا و غیره در چرخه‌های مختلف زیستی باعث افزایش سنتز سیترولین و اسید آمینه‌های آزاد در ریشه اصلی گیاهچه‌های گردو شده و در نتیجه باعث افزایش رشد ریشه‌ها می‌گردد.

نتایج نشان داد که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، تاثیر معنی‌داری بر روی دوره و میزان جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه و تعداد برگ داشتند (شکل ۱). بیشترین درصد جوانه‌زنی در هر دو تیمار سرمادهی و بدون سرمادهی در تیمارهای T11 (یک میلی‌گرم در لیتر IBA ، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و یک میلی‌گرم در لیتر BAP) و T12 (یک میلی‌گرم در لیتر IBA، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و دو میلی‌گرم در لیتر BAP) بود. لذا در این آزمایشات، بین غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و دو میلی‌گرم در لیتر BAP تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. از طرف دیگر، در تیمار بدون سرمادهی تیمار T12 (یک میلی‌گرم در لیتر IBA، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و دو میلی‌گرم در لیتر BAP) دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود. هو و همکاران (۶) بر روی کشت درون شیشه‌ای جنین نابالغ هیکوری (*Carya cathayensis*) که یک گونه زینتی از جنس کاریا می‌باشد تحقیق نمودند. بیشترین جوانه‌زنی و رشد در محیط‌کشت MS با میزان دو میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 حاصل شد. در آزمایشی برای کشت جنین نابالغ پکان از محیط‌کشت DKW استفاده شد و بهترین رشد جنین در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۰۵

میلی‌گرم در لیترIBA و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌دست آمد (۱۶). رنوکداز و همکاران (۱۸ و ۱۹) توانستند گیاهچه‌های پکان (*Carya illinoinensis*) حاصل از کشت جنین بالغ را با کارایی بالایی در محیط‌کشت MS به‌دست آوردند. بهترین تیمار در این آزمایش شامل ۱۸ میکرومول BAP و ۵ میکرومول IBA بود. در تحقیق طوسی و همکاران (۲۶) در پرآوری جنین بالغ گردو بهترین محیط‌کشت NGE بود و بهترین تیمار شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. هارون و آفتاب (۵) در آزمایش خود بر روی کشت لپه پکان، بیشترین رشد ساقه و پرآوری را در محیط‌کشت MS و با غلظت ۱۵ میکرومولBAP به‌دست آوردند. در تحقیق کائور و همکاران (۹) در ریزازدیادی گردو از طریق کشت درون‌شیشه‌ای جنین بالغ محیط‌کشت MS با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 بهترین جوانه‌زنی را نشان داد. سانچز زامورا و همکاران (۲۱) در تحقیق خود در گردو نشان دادند بهترین محیط‌کشت WPM و بهترین محیط‌کشت پرآوری محتوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

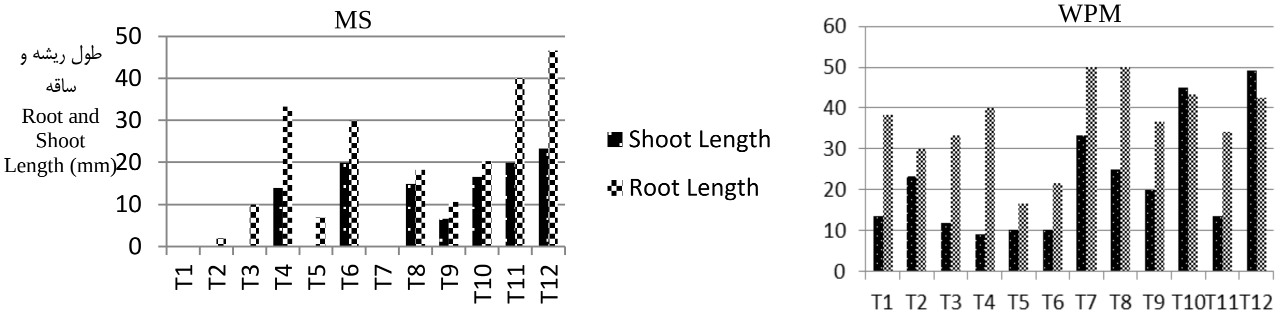
جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر پیش تیمار سرمایی، محیط کشت و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر صفات جوانه‌زنی جنین پکان در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3- Mean comparison of the effect of cold pretreatment, medium and PGRs on *in vitro* embryo germination characters of pecan

پیش تیمار سرمادهی Cold pretreatment	محیط کشت Medium	تیمار هورمونی PGRs treatment	دوره جوانه‌زنی Germination period (day)	درصد جوانه‌زنی Germination percentage (%)	طول ساقه Shoot length (mm)	تعداد برگ Leave no.	طول ریشه اصلی Main root length (mm)
عدم پیش سرمادهی Without cold pretreatment	MS	T1	12b	100a	13.33d	1.33d	38.33a
		T2	10.66b	100a	23.33c	2.33b	30b
		T3	8c	100a	11.66e	1.66c	33.33b
		T4	6c	44.44b	9e	1.33d	40a
		T5	2d	11.11c	10e	0.66d	16.66
		T6	9.33bc	100a	10e	1d	21.66c
		T7	10.66b	100a	33.33b	3.66a	50a
		T8	10.33b	100a	25c	1.66c	50a
		T9	10.33b	100a	20d	2.33b	36.66b
		T10	6.66c	100a	45a	2.66b	43.33a
		T11	10bc	100a	13.33d	1.66c	34b
		T12	8c	100a	49a	2.66b	42.33a
با پیش سرمادهی With cold pretreatment	MS	T1	13.66b	100a	23.33c	2.33b	16.66c
		T2	12.66b	100a	11.66e	1d	43.33a
		T3	19.66a	100a	13.33d	1.33d	24c
		T4	5.33d	44.44b	30bc	1.66c	6.66d
		T5	8.66c	100a	30bc	2.33b	26.66b
		T6	2.66d	11.11c	20d	0.66d	6.66d
		T7	10.66b	44.44b	6.66de	0.66d	16.66c
		T8	15.66a	100a	10.66e	1d	38.33a
		T9	12b	100a	11.66e	2.66b	46.66a
		T10	0e	0c	0e	0e	0d
		T11	10bc	100a	25c	1.66c	35b
		T12	8.33c	44.44b	10e	0.66d	20c
بدون پیش سرمادهی Without cold pretreatment	WPM	T1	0e	0c	0f	0e	0d
		T2	12b	44.44b	0f	0e	2d
		T3	6c	11.11c	0f	0e	10d
		T4	8c	100a	14d	1.66c	33.33b
		T5	14b	44.44b	0f	0e	7d
		T6	12b	100a	20d	2c	30b
		T7	0e	0c	0f	0e	0d
		T8	5.33d	44.44b	15d	1.66c	18.33c
		T9	10.66b	44.44b	6.66de	0e	10.66d
		T10	10.33b	100a	16.66d	1.33d	20.33c
		T11	10.66b	100a	20d	2.66b	40a
		T12	7.33c	100a	23.33c	2.66b	46.66a
با پیش سرمادهی With cold pretreatment	WPM	T1	0e	0c	0f	0e	0d
		T2	7.33c	11b	0f	0e	3.33d
		T3	0e	0c	0f	0e	0d
		T4	0e	0c	0f	0e	0d
		T5	6.33c	11c	0f	0e	10d
		T6	17a	100a	15.33d	2c	26.66b
		T7	0e	0c	0f	0e	0d
		T8	12.66b	44.44b	0f	0e	12.66d
		T9	18a	100a	0f	0e	22.33c
		T10	6c	44.44b	8.66e	1d	23.33c
		T11	9.66c	100a	28.33c	2.33b	30b
		T12	10bc	100a	18.33d	1.33d	16.66c
	LSD		4.7	14.44	9.26	0.77	12.78

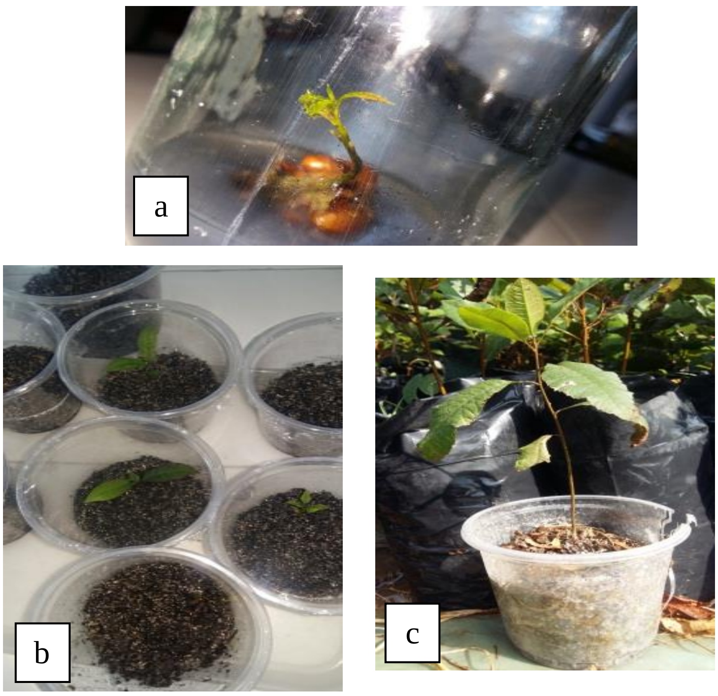
سادات و هنرتی (۲۰) فاکتورهای موثر بر پرآوری را در گردو بررسی نمودند و به مقایسه محیط‌کشت‌های مختلف، تنظیم کننده‌های رشد و فاکتورهای سفت کننده محیط پرداختند. جمع‌بندی آنها حاکی از آن بود که بهترین محیط‌کشت برای جوانه‌زنی جنین بالغ گردو، محیط‌کشت DKW با میزان ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل بود که با یک میلی‌گرم در لیتر IBA غنی شده بود.

مشاهده تمام این منابع حاکی از آن است که تعیین شرایط درون شیشه‌ای مناسب رشد برای هر نوع گونه گیاهی ضروری است و بایستی بهترین محیط‌کشت در جوانه‌زنی درون شیشه‌ای و بهترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای پرآوری مورد آزمون و سنجش قرار گیرد. عبیدی و اسمیت (۱۴) ارگانوزنز را از لپه‌های بالغ پکان و بندهای جنینی به‌دست آوردند. بندهای جنینی در محل گره‌های لپه‌ها تشکیل ۸۵ درصد ریزشاخه نمودند و ۳۰ درصد آنها در محیط‌کشت عاری از اکسین بعد از پیش تیمار با ۲۰ میکرومول ایندول بوتیریک اسید (IBA) تولید ریشه نمودند. جوانه‌های نابجا بر روی سطح کالوس ظاهر شدند. این کالوس در محیط‌کشت محتوی TDZ (۲۵ میکرومول) و بر روی گره‌های لپه و ریشه‌چه تولید شده بود. در تحقیق حاضر، گیاهچه‌های حاصله در همه محیط‌کشت‌ها دارای ریشه قوی‌تری نسبت به ساقه بودند. نتایج مشابه در تحقیق کائور و همکاران (۹) در کشت جنین بالغ گردو نیز به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- طول ریشه و ساقه گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین پکان در محیط‌کشت‌های MS و WPM

Figure 2- Root and shoot length of peacan embryo seedlings in MS and WPM media



شکل ۳- مراحل مختلف کشت جنین رسیده پکان (a)، انتقال به خاک (b) و سازگاری در گلخانه (c)

Figure 3- Mature pecan embryo culture (a), soil transfer (b) and greenhouse acclimation(c)

نتیجه‌گیری

پکان مانند گردو یکی از گیاهان سخت بارزا[1] در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. بنابراین شناخت محیط‌کشت مناسب برای جوانه‌زنی و سپس پرآوری آن در شرایط درون شیشه‌ای ضرورت دارد. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند برای تولید نهال پکان از طریق کاشت جنین بالغ در شرایط درون شیشه‌ای به‌کار گرفته شود. نهال‌های کشت بافتی حاصله می‌توانند ماده اولیه برای مطالعات دیگر در زمینه‌های فیزیولوژی، بیماری‌شناسی، بیوتکنولوژی، تولید پایه بذری برای پیوند و جنین‌زایی سوماتیکی باشد. در این تحقیق بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی جنین بالغ پکان محیط‌کشت MS بود. همچنین بهترین تیمار برای جوانه‌زنی جنین بالغ پکان شامل یک میلی‌گرم در لیتر IBA، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و دو میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

منابع

1- Ajamgard F., Rahemi M., and Vahdati K.2017. Detremining the pollinizer for Pecan cultivars. Journal of Nuts 8(1): 41-48.
2- Ajamgard F., Rahemi M., and Hassani D. 2013.Introduce pecan [*Carya illinoinensis* (Wagenh.) K. Koch] for Khuzestan province. Detection in Agronomical and Horticultural Plants 2(2): 129-142. (In Persian)
3- Deng M.D., and Cornu D. 1992. Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 195-202.
4- Finkelstein R., Wendy R., Tohru A., and Camille S. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. Annual Review of Plant Biology 59: 387-415.
5- Haroon A., and Aftab F. 2008. Adventitious regeneration of pecan using immature cotyledonary explant. Genomics, Proteomics, Metabolics: Recent trends in Biotechnology 352-354.
6- Hu H., Zhang Q., Jiang X., Huang J., Han K., Shen Y., Lv F., and Huang F. 2011. Efficient immature embryo germination in vitro of hickory (*Carya cathayensis* Sarg.). Propagation of Ornamental Plants 11(2): 96-101.
7- Heile-Sudholt C., Huetteman C.A., Preece J.E., Van Sambeek J.W., and Gaffney G.R. 1986. In vitro embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L. Plant cell, Tissue and Organ Culture 6: 189-197.
8- Jafari Mofidabadi A. 2014. Application of Embryo Rescue Technique in *Juglans regia L. x J. nigra L*. Hybridization. Journal of Medicinal Plants and By-products 2: 211-214.
9- Kaur R., Sharma N., Kumar K., Sharma D.R. and Sharma S.D. 2006. In vitro germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. Scientia Horticulturae 109: 385-388.
10- Lee B.C., Shim S.Y., and Lee S.K. 1988. Mass propagation of somatic embryos in *Juglans regia* L. (English walnut). Research Report of the Institute of Forest Genetics, Korea 24: 99–106.
11- Mapelli S., Bram Billa I., and Bertani A. 2001. Free amino acids in walnut kernels and young seedlings. Tree Physiology 21: 1299-1302.
12- McCown B.H., and Lloyd G. 1981. Woody Plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. Hortscience 16: 453.
13- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
14- Obeidy A., and Smith M.A.L. 1993. Organogenesis and somatic embryogenesis from mature pecan embryonic axes. Horticulture Science 28: 213-215.
15- Payghamzadeh K., Kazemitabar S.K., and Amiri A. 2011. Effects of Two Type of Medium Cultures, Gibberellic Acid and Some Physical Factors on Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Embryos Germination. Journal of Horticulture Science 25 (1): 45-54.
16- Payghamzadeh K., and Kazemitabar S.K. 2010. In vitro germination of Pecan (*Carya illinoinensis*) embryo. Biharean Biologist 4(1): 37-43.
17- Rajasekaran K., Vine J., and Mullins M.G. 1982. Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. Planta 154: 139-144.
18- Renukdas N.N., Manoharan M., and Garner J.O. 2010.In vitro propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. Plant Biotechnology 27: 211-215.
19- Renukdas N.N., Manoharan M., and Garner J.O. 2008. In vitro plant regeneration of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant 44: 342-363.
20- Saadata Y.A., and Hennerty M.J. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia*

1- recalcitrant

L.). Scientia Horticulturae 95: 251–260.
21- Sanchez-Zamora M.A., Diego Frutos Tomas J.C.T., and Garcia-Lopez R. 2006. Embryo germination and proliferation in vitro of *Juglans regia* L. Scientia Horticulturae 108(3): 317-321.
22- Sharma D.R., Kaur R., and Kumar K.1996. Embryo rescue in plants, a review. Euphytica 89: 325-337.
23- Sun T.P., and Frank G. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annual Review of Plant Biology 55: 197-223.
24- Tang H., Zhenglong R., and Gabi K. 2000. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salt. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 36: 47-50.
25- Thompson, Tommy E. and Conner, Patrick J.2012. "Chapter 20: Pecan". Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. 1322p.
26- Toosi S., Dilmaghani K., and Hikmatshoar H. 2010. Proliferation of *Juglans regia* L. by in vitro embryo culture. Middle-East Journal of Scientific Research 6 (1): 1-7.
27- Tulecke W., and McGranahan G.H. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. Plant Science 40: 57–63.

Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.2, Summer 2020, P. 197-206
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۰۶-۱۹۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

In Vitro Mature Embryo Germination of Pecan (*Carya illinoensis*)

M. Ghazaeian[1]- Gh.H. Davarynejad[2*]- K. Ghasemi Bezdi[3]- H. Nemati[4]
Received: 23-05-2018
Accepted: 03-07-2019

Introduction: The walnut family (Juglandaceae) consists of approximately 60 species of deciduous trees is native of the American continents, Europe, and Asia. Pecan (*Carya illinoensis*) is belonged to the Juglandaceae family and is one of the most valuable nut products all over the world. Embryo culture techniques for plant breeding as well as basic studies in physiology and biochemistry are widely used. The low percentage of germination and the long propagation cycle and the need for stratification treatments from three to six months are the most important barriers to the development of high yielding cultivars through hybridization. Plant regeneration methods from embryo culture in vitro allows overcoming the barriers of hybridization, as well as obtaining higher and faster multiplication rate of plants of an elite genotype.

Materials and Methods: In this experiment, an adapted native genotype of pecan in Gorgan city, Golestan province, Iran was selected. The mature fruits were harvested after five months of pollination. They were immediately transferred to the laboratory. For cold pretreatment, nuts packed in a paper bag and stored in 4-5ºC for 15 days. The effect of two types of culture medium, growth regulators and seed pretreatment (15 days at 4-5 °C) on germination of mature embryos of pecan has been determined. Murashige and Skoog (MS) and Woody Plant Medium (WPM) and IBA (0 and 1 mgl-1), BAP (0, 1 and 2 mgl-1) and GA_3 (0 and 1 mgl-1) media were used to embryo rescue evaluation. The data obtained were statistically analyzed in completely randomized block design (RCBD). Each treatment was replicated at least third, and each replicate consisted of two zygotic embryos. Means of germination period, percent of seed germination, root and shoot length and leaf number in different media and various PGRs combination were compared based on LSD at $p \leq 0.05$.

Results and Discussion: The results showed, although cold pretreatment for 15 days had no effect on germination period, root length and number of leave but also, effect on germination percentage and shoot length. There are some different hypothesis about the effect of cold pretreatment on embryo germination between researchers. Some researchers believed that, there is low efficiency in embryo germination in lack of cold pretreatment and GA_3. Cold pretreatment or GA_3 reduce the ABA level and promote embryos germination. The others reported poor germination for somatic embryos when they treated with GA_3 and cold pretreatments. Pearce *et al.* (1987) reported that GA_3 and substrate of GA_3 can be increased during the chilling process as ABA levels decrease. Furthermore, application of exogenous GA_3 induces germination. Tang *et al.* (2000) reported that somatic embryos germination poorly happened in cold condition and addition of GA_3 did not change the poor germination. Kaur *et al.* (2006) and Peyghamzadeh and Kazemitabar (2010), reported that the embryo germination in *Juglans regia* L. was higher when GA_3 and cold pretreatments were simultaneously applied as compared to those when applied separately. In this experiment, media has no effect on embryo germination period but, could effect on other parameters. As the results showed, MS media showed the maximum percentage of germination, root and shoot length and number of leave in both condition (with and without cold pretreatment). In this experiment root length of germinated pecan embryo was higher in MS medium. Mapelli *et al*. (2001) reported that seed germination resulted in marked changes in the metabolism of free amino acids in walnut cotyledons. About 52% of the total free amino acids in one-month-old seedlings was present in the cotyledons and about 26% was in the taproot. The concentration of free amino acids in the taproot was similar to that in the embryonic axis, and greater than that in the cotyledons. T11 (1mg/l^{-1} IBA, 1mg/l^{-1}BAP and 1mg/l^{-1} GA_3) and T12 (1mg/l^{-1} IBA, 2mg/l^{-1}BAP and 1mg/l^{-1} GA_3) treatments were the highest in germination percentages in both treatment (with and without cold pretreatment). There was no significant differences between 1 mgl^{-1} and 2 mgl^{-1} of BAP.

Conclusion: Pecan as like walnut, is considered to be one of the most recalcitrant species *in vitro*. It is necessary to determine the optimal culture conditions to establish it for shortening time in seed propagation. This

1, 2 and 4- Ph.D. Student, Professor and Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Landscape, Ferdowsi University of Mashhad, Ira, respectively.
(*- Corresponding Author Email: davarynej@um.ac.ir)
3- Assistant Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Cotton Research Institute, Gorgan, Iran

seedling could be applied as primary material for breeding programs, grafting and physiology study. The best growth of micro plant achieved in MS medium with 1 mgl^{-1}IBA, 1 mgl^{-1}GA3 and 2 mgl^{-1}BAP.

Keywords: Embryo, *In vitro* micropropagation, Juglandaceae, Propagation